表皮生长因子调控猪肠上皮细胞中钠依赖 IIb 型磷转运蛋白表达的细胞信号通路研究

邢廷杰　汤小朋　曹满湖　方热军*

（湖南农业大学动物科学技术学院，湖南畜禽安全生产协同创新中心，长沙 410128）

摘　要：本研究旨在探讨表皮生长因子（EGF）调控猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 中钠依赖 IIb 型磷转运蛋白（NaPi-IIb）表达的分子机制。试验分别用 EGF 受体酪氨酸激酶抑制剂（tyrphostin AG 1478）、蛋白激酶 A（PKA）抑制剂（H89）、蛋白激酶 C（PKC）抑制剂（k4393）、p38 抑制剂（SB 203580）、细胞外信号调节激酶（ERK）抑制剂（PD98059）、c-Jun 氨基末端激酶（JNK）抑制剂（anisomycin）与 EGF 共同处理 IPEC-J2 细胞，利用 Western blot 检测相关通路蛋白及目的蛋白（*NaPi-IIb*）的表达水平。结果显示，相较于对照组，EGF 处理后 *NaPi-IIb* 表达水平显著降低（P<0.05）；相较于无抑制剂组，EGF 受体、PKA、PKC、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）/p38、MAPK/ERK1/2、MAPK/JNK 的特异性抑制剂处理 IPEC-J2 后，*NaPi-IIb* 表达水平显著提高（P<0.05），其中添加 MAPK/ERK1/2 特异性抑制剂显著降低了 MAPK/ERK1/2 在 Tyr204 位点的磷酸化水平（P<0.05），添加 MAPK/JNK 的特异性抑制剂显著降低了 MAPK/JNK1/2/3 在 Thr183 和 Tyr185 位点的磷酸化水平（P<0.05），说明该 2 组抑制剂对该通路的抑制作用是通过降低上述位点的磷酸化水平实现的。本研究结果表明 EGF 受体、PKA、PKC、p38、ERK 和 JNK 均介导了 EGF 调控 IPEC-J2 细胞中 *NaPi-IIb* 的表达。

关键词：表皮生长因子；磷；*NaPi-IIb*；信号通路；猪小肠上皮细胞

中图分类号：S811

磷是动物机体必需的矿物元素之一，在动物生长发育、骨骼形成、能量代谢、核酸合成、细胞信号转导以及维持血液酸碱平衡中起着重要作用[1-2]。钠依赖 IIb 型磷转运蛋白（sodium dependent phosphate cotransporters type IIb，NaPi-IIb）介导的跨上皮细胞磷主动吸收是小肠磷吸收的主要方式[3]。小肠 *NaPi-IIb* 的表达受许多因素调控，表皮生长因子（epidermal growth factor,EGF）是调节其表达的重要因素之一[4-6]。EGF 是一种由泌乳乳房、下颌腺、肾脏、十二指肠 Brunner 腺、胰腺和胎盘等分泌的促生长因子，具有促进细胞生长、细胞迁移、细胞增殖、伤口愈合、骨骼愈合及营养物质转运等生物学功能[2,7-8]。EGF 调节细胞多种生理功能

收稿日期：2016-12-20

项目基金：国家自然科学基金面上项目（31572419）；长沙市科技计划项目（kh1601185）

作者简介：邢廷杰(1981—)，男，湖北阳新人，博士研究生，从事动物营养与饲料研究。E-mail: xingtingjie@dbn.com.cn

*通信作者：方热军，教授，博士生导师，E-mail: fangrj63@126.com

依赖于与细胞表面的 EGF 受体结合[8]。EGF 能使 EGF 受体酪氨酸残基自磷酸化，磷酸化的酪氨酸残基为多种信号分子提供了锚定位点，进而可以调节细胞内多种信号分子如蛋白激酶 A（protein kinase A，PKA）、蛋白激酶 C（protein kinase C，PKC）、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase，MAPK）/p38、MAPK/细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases，ERK）1/2 和 MAPK/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase，JNK)等介导相应的目的基因的表达[9]。

虽然 Xu 等[4-5]报道了 EGF 可通过修饰 c-Myb 蛋白与 *NaPi-IIb* 基因的亲和力，然后通过 PKC/PKA 和 MAPK 信号通路实现下游启动子功能的调节，从而抑制人小肠细胞（Caco-2 细胞）*NaPi-IIb* 的转录活性而降低其表达水平。本课题组前期研究也表明 EGF 可抑制猪小肠上皮细胞 *NaPi-IIb* 基因的表达，并确定 EGF 在 *NaPi-IIb* 基因的启动子上的反应原件，即 c-Myb 在 *NaPi-IIb* 基因启动子上的结合位点为－1 092~－1 085 bp（5'-TCCAGTTG-3'）[6]。但是，目前尚不清楚 EGF 主要是通过何种信号通路来调节猪肠上皮细胞中 *NaPi-IIb* 表达。因此，本研究拟采用相应的信号分子的特异性抑制剂，包括 EGF 受体酪氨酸激酶抑制剂（tyrphostin AG 1478）、PKA 抑制剂（H89）、PKC 抑制剂（k4393）、p38 抑制剂（SB 203580）、ERK 抑制剂（PD98059）和 JNK 抑制剂（anisomycin）与 EGF 共同处理猪小肠上皮细胞 IPEC-J2，考察 *NaPi-IIb* 在蛋白水平的表达，以期明确 EGF 调控猪小肠上皮细胞 *NaPi-IIb* 表达的确切途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及抗体

猪 EGF（武汉三鹰）；DMEM/F12、十二烷基硫酸钠（SDS）（Sigma，美国）；0.25%胰蛋白酶–乙二胺四乙酸（EDTA）（Invitregen，美国）；30%丙烯酰胺溶液（南京建成）；胎牛血清、小牛血清、四甲基乙二胺（TEMED）、显影粉、定影粉、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）凝胶配制试剂盒（长沙艾佳生物公司）；青–链霉素（华中农大兽药厂）；脱脂奶粉（伊利）；预染 Marker（Fermentas，加拿大）；蛋白 Marker（碧云天生物公司）；BAC 蛋白浓度检测试剂盒（碧云天生物公司）；过硫酸铵（上海生工）；硝酸纤维素（NC）膜（Millipore，美国）；滤纸（Whatman，美国）；胶片（Kodak，美国）；增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）试剂盒（Pierce，美国）。

EGF 受体酪氨酸激酶抑制剂（T4182-5MG，Sigma，美国）；PKA 抑制剂（S1643，碧云天公司）；PKC 抑制剂（K4393-10UG，Sigma，美国）；p38 抑制剂（SML0543-25MG，Sigma，美国）；ERK 抑制剂（SCP0214，Sigma，美国）；JNK 抑制剂（S5567-10MG，Sigma，

美国）。

NaPi-IIb 一抗（21295-1-AP，Proteintech，美国）；PKA 催化亚基 β 一抗（ab187515，Abcam，英国）；PKA 调节亚基Iβ 一抗（ab94613，Abcam，英国）；PKAα/β/γ 一抗（ab211265，Abcam，英国）；PKCα 一抗（ab32376，Abcam，英国）；PKCβ 一抗（ab4132，Abcam，英国）；PKCγ 一抗（ab71558，Abcam，英国）；磷酸 p38 MAPK(Tyr323)一抗（bs-5477R，Bioss，美国）；磷酸 p38 MAPK(Thr180)一抗（bs-5476R，Bioss，美国）；磷酸 ERK1/2(Thr202+Tyr204)一抗（bs-3016R，Bioss，美国）；磷酸 ERK1(Thr197+Thr202)一抗（bs-3292R，Bioss，美国）；JNK1+JNK2+JNK3 一抗（bs-2592R，Bioss，美国）；磷酸 JNK1+JNK2+JNK3(Thr183+Tyr185)一抗（bs-1640R，Bioss，美国）；磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）一抗(ab8245，Abcam，英国)；下丘脑调节性多肽（HRP）标记二抗（Santa Cruz Biotechnology，美国）；抗鼠免疫球蛋白 G-HRP(1∶1 000)（北京索莱宝生物公司）；抗兔免疫球蛋白 G-HRP(1∶500)（北京索莱宝生物公司）。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养

猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 由中国科学院亚热带农业生态研究所惠赠。IPEC-J2 细胞培养于 DMEM/F12 完全培养基（含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素双抗）中，每 24 h 换 1 次液，当细胞 80%融合时用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化传代。IPEC-J2 细胞置于 37 ℃、含 5% CO_2 的细胞培养箱中常规培养。

1.2.2 EGF 受体抑制剂处理对 *NaPi-IIb* 表达的影响

取对数生长期细胞，用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化后接种至 6 孔板中（1×10^5 个/孔），用 DMEM/F12 完全培养基培养细胞，在显微镜下观察细胞形态，待细胞 80%的融合时，换为 DMEM/F12 不完全培养基（无血清无激素，含青霉素/链霉素）过渡培养 16 h，然后试验组加入 100 ng/mL EGF[6]，并分别加入 0、1、2、5、10 和 20 μmol/L EGF 受体抑制剂，对照组加入相同体积的培养基，细胞继续培养 8 h。所有处理均为 6 个重复。培养结束后收集细胞进行 Western blot 分析。

1.2.3 PKA、PKC、ERK、JNK 和 p38 抑制剂处理对 *NaPi-IIb* 表达的影响

取对数生长期细胞，用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化后接种至 6 孔板中（1×10^5 个/孔），用 DMEM/F12 完全培养基培养细胞，在显微镜下观察细胞形态，待细胞 80%的融合时，换为 DMEM/F12 不完全培养基（无血清无激素，含青霉素/链霉素）过渡培养 16 h，然后对照组加入 100 ng/mL EGF[6]，试验组加入 100 ng/mL EGF 并分别加入 PKA、PKC、p38、ERK

和 JNK 抑制剂，细胞继续培养 8 h。所有处理均为 6 个重复。培养结束后收集细胞进行 Western blot 分析。

1.3 Western blot 分析

1.3.1 细胞蛋白样品制备

细胞培养结束后，弃去培养液，用 37 ℃预热的磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤细胞 2~3 遍，加入适量预冷的蛋白裂解液置于冰上 10~20 min。用细胞刮刮下细胞，收集在 EP 管后超声（100~200 w）3 s。12 000×*g* 离心 5 min。采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度。将所有蛋白样品调至相等浓度，充分混合沉淀后加加样缓冲液后直接上样，剩余溶液（溶于 1×加样缓冲液）－70 ℃保存。

1.3.2 Western blot 检测

Western blot 程序参照 Xiong 等[10]介绍的方法。根据目的蛋白分子质量的大小，采用 8%、10%、12%与 15%的分离胶，5%的浓缩胶将目的蛋白分离。室温恒流转膜 90 min，将蛋白转移至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，随后用含 5%脱脂牛奶的对苯二甲酸丁二醇酯（PBST）缓冲液室温封闭 1 h，然后与 NaPi-IIb 一抗（1：500）；PKA 催化亚基 β 一抗（1：500）、PKA 调节亚基Iβ 一抗（1：1 000）、PKAα/β/γ 一抗（1：500）、PKCα 一抗（1：1 000）、PKCβ 一抗（1：1000）、PKCγ 一抗（1：1 000）、磷酸 p38 MAPK (Tyr323) 一抗（1：500）、磷酸 p38 MAPK(Thr180)一抗（1：500）、磷酸 ERK1/2(Thr202+Tyr204)一抗（1：500）、磷酸 ERK1（Thr197+Thr202）一抗（1：500）、JNK1+JNK2+JNK3 一抗（1：500）、磷酸 JNK1+JNK2+JNK3（Thr183+Tyr185）一抗（1：500）、GAPDH 一抗（1：800）4 ℃孵育过夜。经 PBST 缓冲液清洗 3 次，用抗鼠免疫球蛋白 G-HRP（1：8 000）或抗兔免疫球蛋白 G HRP（1：4 000）室温孵育 1 h，孵育后弃去二抗，用 PBST 缓冲液清洗膜 3 次，使用辣根过氧化物酶 HRP-ECL 法对 PVDF 膜上的蛋白进行显影。具体的方法是将 ECL 试剂盒中 A 液和 B 液按比例稀释混合，然后涂在 PVDF 膜上。将 PVDF 膜放置在 Western blot 成像仪上进行扫描，然后进行拍照保存。结果用 Image J 凝胶分析软件进行光密度分析，用 GAPDH 作为内参。

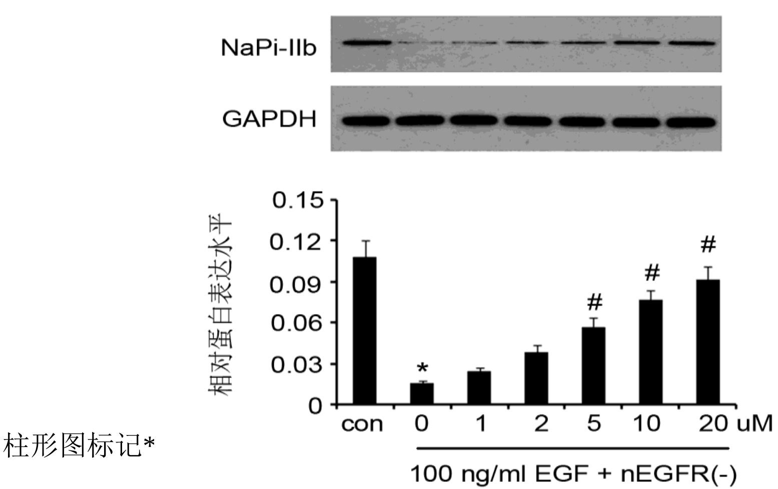
1.4 统计分析

EGF 受体抑制剂试验采用 SAS 9.2 统计软件 ANOVA 法进行单因子方差分析，Duncan 氏法进行多重比较，PKA、PKC、p38、ERK 和 JNK 抑制剂处理试验采用 SAS 9.2 统计软件的 *t* 检验进行分析比较。试验数据用平均值±标准误表示，$P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1　EGF 受体酪氨酸激酶抑制剂干预后 *NaPi-IIb* 表达水平

为了证实 EGF 受体介导了 EGF 对 *NaPi-IIb* 表达水平的调节，我们在用 100 ng/mL EGF 处理 IPEC-J2 细胞的同时添加了不同浓度的 EGF 受体抑制剂（0~20 μmol/L）。用 Western blot 检测发现随着 EGF 受体抑制剂浓度不断升高，*NaPi-IIb* 表达水平也逐渐升高（图 1）。相较于对照组，未添加 EGF 受体抑制剂的 EGF 处理中 IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 表达水平显著降低（*P*<0.05）；相较于未添加 EGF 受体抑制剂的 EGF 处理，添加 5、10 或 20 μmol/L 的 EGF 受体抑制剂显著提升了 IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 表达水平（*P*<0.05），而添加 1 或 2 μmol/L 的 EGF 受体抑制剂对 IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 表达无显著影响（*P*>0.05）。这表明 EGF 受体介导了 EGF 对 *NaPi-IIb* 表达水平的调节。



柱形图标记* … F 处理相比差异显著（*P*<0.05），标记##表示与 EGF 处理相比差异极显著（*P*<0.01）。下图同。

Column diagram with * superscripts mean significantly different compared with control group (*P*<0.05), and with # superscripts mean significantly different compared with EGF treatment (*P*<0.05), while with ## superscripts mean extremely significantly different (*P*<0.01). The same as below.

图 1　EGF 受体酪氨酸激酶抑制剂干预后 *NaPi-IIb* 表达水平

Fig.1　*NaPi-IIb* expression level after intervention with EGF receptor tyrosine kinase inhibitor

2.2　PKA 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

为了证实信号分子 PKA 介导 EGF 对 *NaPi-IIb* 表达水平的调节，我们在用 100 ng/mL EGF 处理 IPEC-J2 细胞的同时添加了 PKA 的特异性抑制剂。Western blot 检测显示 PKA 的特异性抑制剂没有改变 PKA 催化亚基 β、PKA 调节亚基Iβ 和 PKAα/β/γ 的表达水平（图 2），说明 PKA 的特异性抑制剂抑制 PKA 活力不是通过影响 *PKA* 的表达水平，而是通过其他方式实现的。添加 PKA 的特异性抑制剂，IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 的表达显著上升（*P*<0.05），这

表明信号分子 PKA 介导了 EGF 对 IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 表达水平的调节。

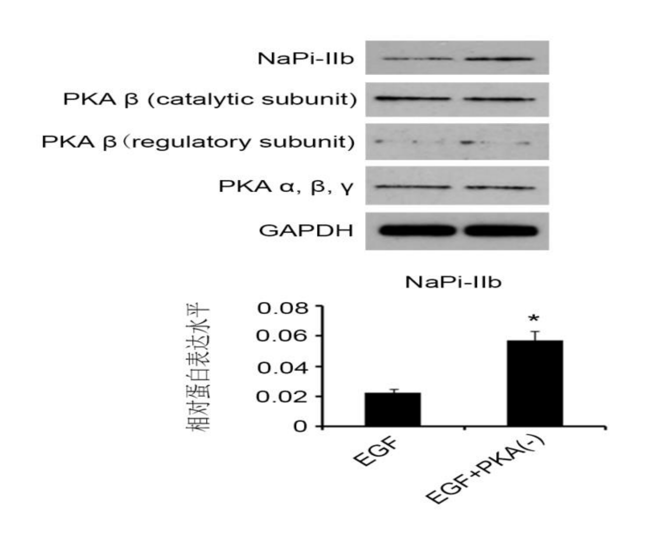


图 2　PKA 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

Fig.2　Effects of PKA signal path on EGF regulating *NaPi-IIb* expression

2.3　PKC 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

由图 3 可知，PKC 的特异性抑制剂并没有改变 *PKC*α、*PKC*β 和 *PKC*γ 的表达水平，说明 PKC 的特异性抑制剂抑制 PKC 的活力不是通过影响 *PKC* 的表达水平，而是通过其他方式。但是，添加 PKC 的特异性抑制剂极显著地抑制了 EGF 下调 *NaPi-IIb* 的表达水平（$P<0.01$）。这表明 PKC 是 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达水平的关键信号分子。

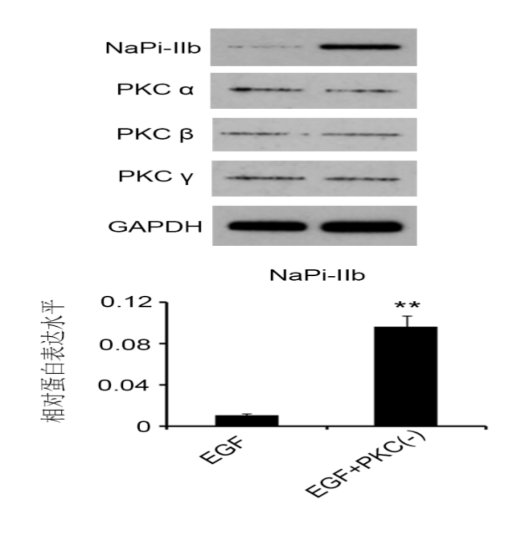


图 3　PKC 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

Fig.3　Effects of PKC signal pathway on EGF regulating *NaPi-IIb* expression

2.4　MAPK/p38 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

由图 4 可知，MAPK/p38 的特异性抑制剂没有改变 MAPK/p38 在 Tyr323 和 Thr180 位点

的磷酸化水平，这表明 MAPK/p38 特异性抑制剂抑制 MAPK/p38 的活力不是通过影响 MAPK/p38 的表达水平和磷酸化水平。但是，添加 MAPK/p38 的特异性抑制剂显著抑制了 EGF 下调 *NaPi-IIb* 的表达水平（$P<0.05$）。这表明 MAPK/p38 信号通路参与了 EGF 对 *NaPi-IIb* 表达水平的调节。

图 4　MAPK/p38 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

Fig.4　Effects of MAPK/p38 signal pathway on EGF regulating *NaPi-IIb* expression

2.5　MAPK/ERK1/2 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

由图 5 可知，MAPK/ERK1/2 的特异性抑制剂没有改变 ERK1 在 Thr197 和 Thr202 位点的磷酸化水平，但显著降低了 MAPK/ERK1/2 在 Tyr204 位点的磷酸化水平（$P<0.05$），这表明 MAPK/ERK1/2 特异性抑制剂抑制 MAPK/ERK1/2 的活力主要是通过降低 MAPK/ERK1/2 在 Tyr204 位点的磷酸化水平。添加 MAPK/ERK1/2 的特异性抑制剂显著抑制了 EGF 下调 *NaPi-IIb* 的表达水平（$P<0.05$）。这表明 MAPK/ERK1/2 信号分子参与了 EGF 对 *NaPi-IIb* 表达水平的调节。

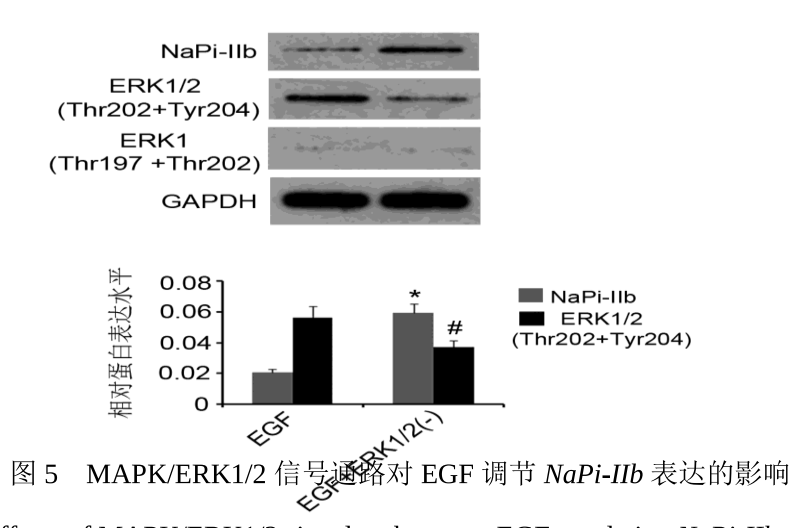


图 5　MAPK/ERK1/2 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

Fig.5　Effects of MAPK/ERK1/2 signal pathway on EGF regulating *NaPi-IIb* expression

2.6　MAPK/JNK 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

由图 6 可知，MAPK/JNK 的特异性抑制剂没有改变 MAPK/JNK1/2/3 的表达水平，但是显著降低了 MAPK/JNK1/2/3 在 Thr183 和 Tyr185 位点的磷酸化水平（P<0.05），这表明 MAPK/JNK1/2/3 特异性抑制剂抑制 MAPK/JNK1/2/3 的活力主要不是通过下调 MAPK/JNK1/2/3 的表达水平，而是通过降低 MAPK/JNK1/2/3 在 Thr183 和 Tyr185 位点的磷酸化水平。添加 MAPK/JNK1/2/3 的特异性抑制剂显著反转了 EGF 下调 *NaPi-IIb* 的表达水平（P< 0.05）。这表明 MAPK/JNK1/2/3 信号通路参与了 EGF 对 *NaPi-IIb* 表达水平的调节。

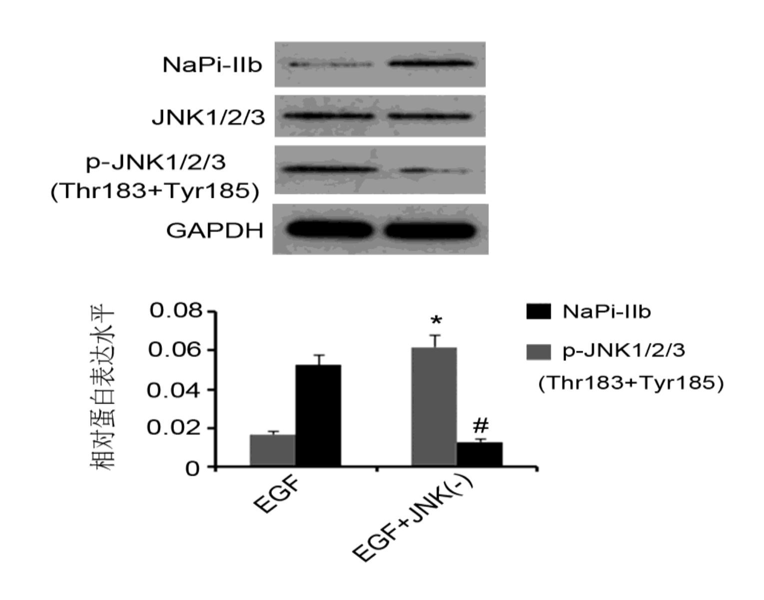


图 6　MAPK/JNK 信号通路对 EGF 调节 *NaPi-IIb* 表达的影响

Fig.6　Effects of MAPK/JNK signal pathway on EGF regulating *NaPi-IIb* expression

3　讨　论

EGF 是一种分子质量为 6 ku，含有 53 个氨基酸残基及 3 个二硫键的小分子肽，具有促进细胞生长、细胞迁移、细胞增殖、伤口愈合、骨骼愈合及营养物质转运等生物学功能[7-8]。大量研究表明 EGF 通过结合并激活细胞表面的 EGF 受体而实现其生物学功能[9,11]。EGF 受体是一种分子质量为 170 ku 的跨膜糖蛋白，主要由细胞外区、跨膜区和细胞内区 3 部分组成[7,9]。当 EGF 与 EGF 受体结合后，EGF 受体二聚化，启动自身的酪氨酸激酶活性，同时结合细胞内多种重要的信号分子，调节细胞内信号转导，这些细胞信号可以调控多种细胞核内的转录因子，诱导或抑制多种基因的转录进而发挥了复杂的生理功能[12-14]。

磷作为一种非再生资源，在动物体内的生物学利用率非常低，如何充分利用磷资源、提高养殖业的经济效益、减少由于过量磷的排泄所造成的环境污染是畜牧业和饲料与动物营养科学有待解决的问题。Xu 等[4-5]研究表明 EGF 可抑制 Caco-2 细胞中 *NaPi-IIb* 基因表达，Xing

等[6]研究也表明 EGF 可抑制 IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 基因的表达。本研究结果同样表明 EGF 处理 IPEC-J2 细胞后 *NaPi-IIb* 表达下降。这些结果表明 EGF 对肠道磷吸收具有重要的调节作用，探明 EGF 对猪小肠 NaPi-IIb 调控的分子机制及其信号通路，对提高磷利用效率，减少磷排泄等具有重要意义。为此，本研究采用 EGF 受体酪氨酸激酶抑制剂、PKA 抑制剂、PKC 抑制剂、p38 抑制剂、ERK 抑制剂和 JNK 抑制剂等与 EGF 共同处理 IPEC-J2 细胞，考察 *NaPi-IIb* 在蛋白水平的表达，以期明确 EGF 调控猪小肠上皮细胞 *NaPi-IIb* 表达的确切途径。

通过使用 EGF 受体抑制剂处理 IPEC-J2 细胞，发现 5、10 或 20 μmol/L 的 EGF 受体抑制剂处理后 IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 表达上升，这说明添加 EGF 受体抑制剂后 EGF 不能抑制 IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 的表达，表明 EGF 抑制 IPEC-J2 细胞 *NaPi-IIb* 表达水平的影响依赖与 EGF 受体的结合。

EGF 与 EGF 受体结合后能激活细胞内多条信号通路，如磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B（PI3K/AKT）、腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）、MAPK、PKC 和 PKA[15-16]。在小鼠肝细胞中发现 EGF 通过直接或间接的方式激活 PKA 促进了 EGF 对 ERK2 的激活，PKA 信号也可以反过来影响 EGF/EGF 受体信号[17]。EGF 激活 PKCα 可能是通过调节磷脂酶 C(PLC)γ，激活后的 PKCα 可磷酸化 Src 诱导 PI3K 激酶磷酸化，随后进一步激活 ERK1/2。PKC 还能调节 EGF 前体转化生长因子（TGF）α、神经调节蛋白 1β 和肝素结合性 EGF 的剪切和细胞中的释放，此外激活 PKC 阻碍了 EGF 受体在 Thr654 位点的磷酸化[18,19]。这表明 EGF 能激活 PKC，而 PKC 能反过来调节 EGF 的分泌和 EGF 受体的活性。EGF 促进小鼠反应性星形胶质细胞中巢蛋白（Nestin）依赖 Ras-Raf-ERK 信号通路。在 EGF 受体-ERK 信号中 Ras 是唯一膜锚定组件，它的位置决定了细胞内的下游信号[20,21]。EGF 也能调节 JNK 和 p38 MAPK 的活性。Cdc42 是 Ras 有关 GTP 结合蛋白，研究表明，Cdc42 绑定衣被蛋白质复合体的 γ 亚基(γCOP)对 Cdc42 调节细胞性状转换起到至关重要的作用。进一步的研究发现 Cdc42 绑定 γCOP 后诱导 EGF 受体的累积，使得 EGF 激活 ERK1/2、JNK 和 PI3K，进而促进细胞分裂[22]。

在人肠道 Caco-2 细胞中，EGF 主要通过调节 MAPK、PKC 和 PKA 来调节 *NaPi-IIb* 的表达[5]。为了证实 MAPK、PKC 和 PKA 是否介导 EGF 在猪小肠上皮细胞中对 *NaPi-IIb* 表达的调节，我们使用了 PKA 抑制剂、PKC 抑制剂、p38 抑制剂、ERK 抑制剂和 JNK 抑制剂。结果表明，这些抑制剂均能阻碍 EGF 下调 *NaPi-IIb* 的表达，说明这些信号分子均介导了 EGF 在这方面的作用，EGF 下调 *NaPi-IIb* 的表达是通过多条信号通路来实现的。需要指出的是

对 PKC 进行抑制后，*NaPi-IIb* 的表达水平极显著提高，而且提高幅度也明显高于对其他信号分子抑制产生的效果。这说明 PKC 介导的信号通路在 EGF 下调 *NaPi-IIb* 的表达过程中起主要作用。

不过，虽然本试验证明 MAPK（p38、ERK 和 JNK）、PKC 和 PKA 介导了 EGF 对猪肠上皮细胞中 *NaPi-IIb* 表达水平的调节，但是这 3 个信号分子介导的信号通路十分复杂，并且这三者之间也存在着紧密联系，它们下游的信号分子最终是如何调节 *NaPi-IIb* 表达的还有待进一步研究。

4 结 论

本研究结果表明 EGF 调控 IPEC-J2 细胞中 *NaPi-IIb* 的表达受 EGF 受体、PKA、PKC 和 MAPK（p38、ERK、JNK）等信号通路的调控。

参考文献：

[1] FANG R J,XIANG Z F,CAO M H,et al.Different phosphate transport in the duodenum and jejunum of chicken response to dietary phosphate adaptation[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2012,25(10):1457–1465.

[2] 汤小朋,刘虎,杨淑芬,等.表皮生长因子在动物肠道无机离子及其他营养物质吸收中的作用[J].动物营养学报,2016,28(8):2317–2323.

[3] FENOLLAR-FERRER C,PATTI M,KNÖPFEL T,et al.Structural fold and binding sites of the human Na^+-phosphate cotransporter NaPi-II[J].Biophysical Journal,2014,106(6):1268–1279.

[4] XU H,COLLINS J F,BAI L Q,et al.Regulation of the human sodium-phosphate cotransporter *NaPi-IIb* gene promoter by epidermal growth factor[J].American Journal of Physiology：Cell Physiology,2001,280(3):C628–C636.

[5] XU H,INOUYE M,HINES E R,et al.Transcriptional regulation of the human NaPi-IIb cotransporter by EGF in Caco-2 cells involves c-myb[J].American Journal of Physiology：Cell Physiology,2003,284(5):C1262-C1271.

[6] XING T,TAN X,YU Q,et al.Identifying the location of epidermal growth factor-responsive element involved in the regulation of type IIb sodium-phosphate cotransporter expression in porcine intestinal epithelial cells[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2016,doi:10.1111/jpn.12645.

[7] 汤小朋,方热军.表皮生长因子对早期断奶仔猪生长性能及肠道健康的影响[J].动物营养学报,2015,27(11):3345–3351.

[8] TANG X P,LIU H,YANG S F,et al.Epidermal growth factor and intestinal barrier function[J].Mediators of Inflammation,2016,2016:1927348.

[9] WEE P,SHI H P,JIANG J,et al.EGF stimulates the activation of EGF receptors and the selective activation of major signaling pathways during mitosis[J].Cellular Signalling,2015,27(3):638–651.

[10] XIONG X,YANG H S,TAN B,et al.Differential expression of proteins involved in energy production along the crypt-villus axis in early-weaning pig small intestine[J].American Journal of Physiology：Gastrointestinal and Liver Physiology,2015,309(4):G229–G237.

[11] SEKAR M C,SHAHIWALA K,LELOUP L,et al.Modulation of epidermal growth factor stimulated ERK phosphorylation and cell motility by inositol trisphosphate kinase[J].Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology,2014,1(2):160–164.

[12] 刘淑杰,徐子伟,齐珂珂,等.表皮生长因子对肠道功能调控的研究[J].动物营养学报,2014,26(3):565–570.

[13] BRAND T M,LIDA M,LI C R,et al.The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer[J].Discovery Medicine,2011,12(66):419–432.

[14] BEIJE N,ONSTENK W,KRAAN J,et al.Prognostic impact of HER2 and ER status of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients with a HER2-Negative primary tumor[J].Neoplasia,2016,18(11):647–653.

[15] MOTEKI H,KIMURA M,OGIHARA M.Activation of extracellular-signal regulated kinase by epidermal growth factor is potentiated by cAMP-elevating agents in primary cultures of adult rat hepatocytes[J].Biological and Pharmaceutical Bulletin,2011,34(10):1542–1552.

[16] IGUCHI H,MITSUI T,ISHIDA M,et al.cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice[J].Endocrine Journal,2011,58(9):747–759.

[17] BREITBART H,ETKOVITZ N.Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction[J].Asian Journal of Andrology,2011,13(1):106–110.

[18] CHEN Y J,TSAI R K,WU W C,et al.Enhanced PKCδ and ERK signaling mediate cell migration of retinal pigment epithelial cells synergistically induced by HGF and EGF[J].PLoS One,2012,7(9):e44937.

[19] DANG M,DUBBIN K,D'AIELLO A,et al.Epidermal growth factor (EGF) ligand release by substrate-specific a disintegrin and metalloproteases (ADAMs) involves different protein kinase C (PKC) isoenzymes depending on the stimulus[J].Journal of Biological Chemistry,2011,286(20):17704–17713.

[20] WANG X Y,GAN M X,LI Y,et al.Cdc42 induces EGF receptor protein accumulation and promotes EGF receptor nuclear transport and cellular transformation[J].FEBS Letters,2015,589(2):255–262.

[21] HONG Z G,CABRERA J A,MAHAPATRA S,et al.Activation of the EGFR/p38/JNK pathway by mitochondrial-derived hydrogen peroxide contributes to oxygen-induced contraction of ductus arteriosus[J].Journal of Molecular Medicine,2014,92(9):995–1007.

[22] KIMURA H,OKUBO N,CHOSA N,et al.EGF positively regulates the proliferation and migration,and negatively regulates the myofibroblast differentiation of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through MEK/ERK- and JNK-dependent signals[J].Cellular Physiology and Biochemistry,2013,32(4):899–914.

Identifying Signaling Pathway that Mediates Epidermal Growth Factor Regulating Sodium Dependent Phosphate Cotransporters Type IIb Expression in Porcine Intestinal Epithelial Cells

XING Tingjie TANG Xiaopeng CAO Manhu FANG Rejun*

(*College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety, Changsha* 410128, *China*)

Abstract: The aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms of epidermal growth factor (EGF) down-regulated sodium dependent phosphate cotransporters type IIb (*NaPi-IIb*) expression in porcine intestinal epithelial cells (IPEC-J2). EGF receptor tyrosine kinase inhibitor (tyrphostin AG 1478), protein kinase A (PKA) inhibitor (H89), protein kinase C (PKC) inhibitor (k4393), p38 inhibitor (SB 203580), extracellular signal regulated kinase (ERK) inhibitor (PD98059) and c-Jun n-terminal kinase (JNK) inhibitor (anisomycin) as well as EGF were used to treat IPEC-J2 cells, respectively, and related signal pathways protein and interest protein (*NaPi-IIb*) expression levels were determined by Western blot. The results showed as follows, compared with control group, *NaPi-IIb* expression level was significantly decreased after EGF treatment (P<0.05). Compared with none inhibitor treatments, inhibitors of EGF receptor, PKA, PKC, mitogen

activated protein kinase (MAPK)/p38, MAPK/ERK1/2 and MAPK/JNK significantly increased *NaPi-IIb* expression (*P*<0.05). Especially, MAPK/ERK1/2 inhibitor significantly reduced the phosphorylation level of MAPK/ERK1/2 at Tyr204 site (*P*<0.05), and MAPK/JNK inhibitor significantly reduced the phosphorylation level of MAPK/JNK1/2/3 at Thr183 and Tyr185 sites (*P*<0.05). In summary, all EGF receptor, PKA, PKC, p38, ERK and JNK participate in the inhibitory effects of EGF on *NaPi-IIb* expression.

Keywords: epidermal growth factor; phosphate; *NaPi-IIb*; signal pathway; porcine intestinal epithelial cells

---

∗Corresponding author, professor, E-mail: fangrj63@126.com (责任编辑　田艳明)